Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
”Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

COPROCULTURA

COD: PSL – M2 – 02

Editia 1, Revizia 0
Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager tehnic
Rodica Fântânaru

VERIFICAT
Responsabil calitate
As. Lorena Zaborila

Elaborat:
Responsabil analiza
Dr. Rodica Fântânaru

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase ”Sf.Parascheva„ Iaşi Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
RC	0.	01.05.2013	As.Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Sef Compartiment	2.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Responsabil analiza	3.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

0. CUPRINS

CAPITOLUL

0 Scop

1 Domeniu de aplicare

2 Documente de referinţă

3 Definiţii şi abrevieri

4 Descrierea activitatii

5 Procedura de lucru

6 Controlul de calitate

7 Comunicare rezultate si valori de referinta

8 Surse de eroare

9 Responsabilitati

10 Inregistrări

1. SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Procedura descrie activităţile şi etapele, din Compartimentul de Microbiologie 2 (produse patologice din situusuri normal contaminate) privind prelucrarea MF în scopul stabilirii diagnosticului etiologic în sindromul diareic acut şi în TIA.
Procedura se aplică în cadrul Compartimentul de Microbiologie 2 al Laboratorului

2. DOCUMENTE DE REFERINŢĂ

2.1. Manualul Calităţii Laboratorului, cod MCL-01,
2.2. SR EN ISO/CEI: 15189: 2007 - Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă
2.3. SR EN ISO/TR 22869 - Laboratoare medicale. Ghid pentru implementarea în laboratoare a ISO 15189 : 2003
2.4. SR EN ISO 15190 : 2005 - Laboratoare medicale. Cerinţe pentru securitate.
2.5. IC-03 Controlul de calitate în microbiologie
2.6. Ministerul Sănătăţii – Academia de Ştiinţe Medicale – Metode curente pentru analize de laborator clinic, Ed. medicală, Bucureşti, 1982
2.7. *Coprologie clinica*, Ed. Medicala, Bucuresti, 1974, I. Gherman
2.8. D. Buiuc, M. Neguţ, *Tratat de microbiologie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 1999
2.9. *Microbiologie clinică* vol I, Ed. Didactică şi Pedagogică, RA Bucureşti 1998, D. Buiuc
2.10. *Metode de laborator vol II*, Academia de ştiinţe medicale, Comisia de Standardizare, Ed. Medicală, Bucureşti 1997
2.11. Manualul de recoltare a produselor biologice, cod:PGL – 5.4-1;
2.12. *Parazitologie medicală,* Ed. ALL, Bucureşti 1994, S.Rădulescu, A.Meyer
2.13. *Baze clinice pentru practica medicală vol IV,* Ed. Medicală, Bucureşti Prof.Dr.Doc. A.Păunescu-Podeanu
2.14. Metodologia anuală de supraveghere şi control a bolii diareice acute (BDA) şi holerei pentru sezonul iunie-noiembrie – Autoritatea de Sănătate Publică
2.15. D.Buiuc, M.Neguţ, *Tratat de microbiologie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 2008

3. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

3.1. Coprocultură: examen microbiologic al materiilor fecale
3.2. Antibiograma: test de laborator care evidenţiază rezistenţa sau sensibilitatea unui germen patogen (bacterie) la diferite antibiotice.
3.3 Izolare bacteriană: cultivarea bacteriilor pe medii de cultură agarizate prin epuizarea inoculului cu ansa
3.4. Primocultură: izolarea bacteriilor din prelevatele patologice
3.5. Cultură pură: cultură formată din descendenţii unei singure colonii rezulta-te după o epuizare a materialului microbian, care duce la creştere sub forma coloniilor bine izolate pe medii agarizate
3.6. Medii de cultură selective: conţin substanţe care inhibă dezvoltarea bacteriilor de contaminare a prelevatelor; pentru izolarea enterobacteriaceelor din prelevate contaminate există medii cu trei niveluri de selectivitate: slab selective care inhibă bacteriile Gram pozitive , moderat selective care inhibă pe lîngă bacteriile Gram pozitive şi o parte din bacilii Gram negativi comensali şi înalt selective care inhibă o gamă mai largă de bacterii comensale

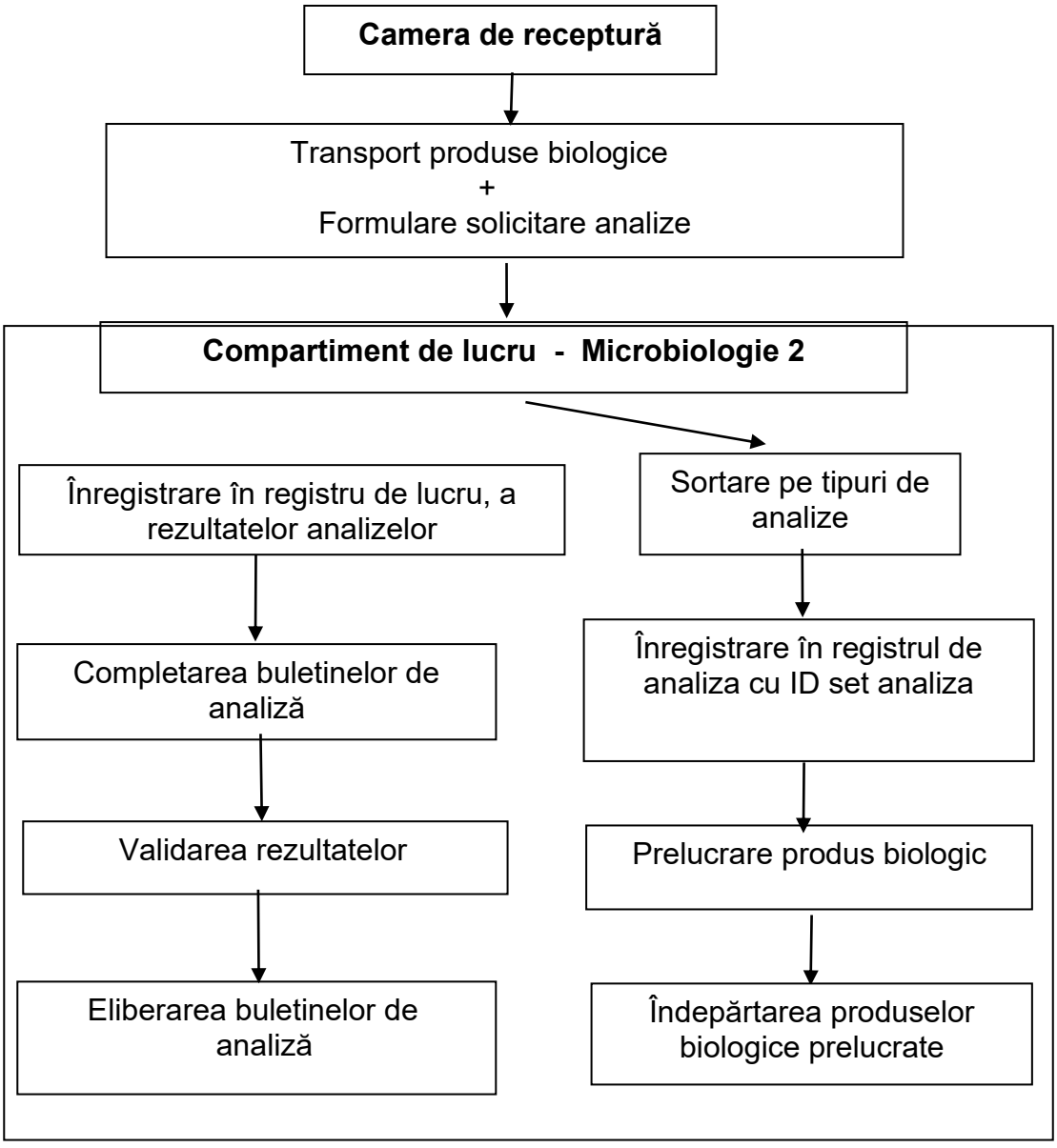
3.7. Medii de îmbogăţire: medii de cultură lichide care prin anumite substanţe inhibitoare, prelungesc faza de lag a bacteriilor de contaminare, fără a întârzia însă intrarea unor patogeni în faza exponenţială.
3.8. Medii diferenţiale: conţin substratul pentru o anumită enzimă bacteriană şi un indicator care atestă atacarea acestui substrat
3.9. Teste biochimice de identificare: teste care se efectuează pe medii speciale de identificare ce conţin anumiţi indicatori şi un substrat , care permit recunoaşterea unei bacterii pe baza activităţii sale biochimice şi identificarea preliminară a acesteia
3.10. Teste serologice (antigenice) de identificare: teste care se efectuează prin reacţii de aglutinare pe lamă sau latex aglutinare ce permit identificarea cu certitudine a unei specii bacteriene

3.2 Abrevieri:
UFC: Unităţi formatoare de colonii
ATCC: American Type Culture Collection
TSI: Triple Sugar Iron (glucoză, zaharoză, lactoză) – mediu de identificare multitest
ADCL: Agar deoxicolat citrat lactoză – mediu moderat selectiv de izolare a Enterobacteriaceelor
MC: Agar Mc Conkey – mediu slab selectiv de izolare a Enterobacteriaceelor
MC-sorb: Agar Mc Conkey cu sorbitol – mediu diferenţial pentru EHEC
AABTL: Agar albastru bromtimol lactoză – mediu diferenţial
WB: Mediul Wilson- Blair – mediu înalt selectiv izolare Salmonella typhi
CIN-Ye: Mediu selectiv de izolare Yersinia
TCBS : Mediu Taurocolat citrat bilă sucroză – mediu înalt selectiv de izolare Vibrio
BSA: Mediu Bilă sare agar – mediu moderat selectiv de izolare Vibrio
AP: Apă peptonată
AP-alc: Apă peptonată alcalină - mediu de îmbogăţire Vibrio
MK: Mediu Karmalli – mediu selectiv Campylobacter
AS: Mediu Agar sânge – mediu nutritiv
TIA: Toxiinfecţie alimentară
EPEC: Enteropatogen Escherichia coli
EHEC: Enterohemoragic Escherichia coli
LA: Latex aglutinare
SF: Ser fiziologic
AD: Apă distilată
MF: Materii fecale
BDA: Boală diareică acută
UV: Ultraviolete

4. DESCRIEREA ACTIVITĂŢII

Activitatea din cursul dimineţii începe prin examinarea culturilor bacteriene dezvoltate în ultimele 24-48 ore, repicarea coloniilor suspecte pe medii de identificare, interpretarea caracterelor biochimice şi identificarea caracterelor antigenice prin aglutinări pe lamă sau latexaglutinare a tulpinilor identificate, examinarea şi interpretarea antibiogramelor efectuate, toate datele fiind consemnate în registrul de analiza. Elaborarea diagnosticului de laborator cu consemnarea acestuia in registrul de analiza si pe formularul de solicitare, este urmata de introducerea lui in SIUI, validarea si eliberarea Buletinului de analiza.

După recepţionarea şi transportul produselor biologice la compartimentul de lucru, activitatea se desfăşoară conform schemei I:


Camera de receptură
Transport produse biologice
+
Formulare solicitare analize
Compartiment de lucru - Microbiologie 2
Înregistrare în registru de lucru, a rezultatelor analizelor
Completarea buletinelor de analiză
Validarea rezultatelor
Eliberarea buletinelor de analiză
Sortare pe tipuri de analize
Înregistrare în registrul de analiza cu ID set analiza
Prelucrare produs biologic
Îndepărtarea produselor biologice prelucrate

4.1.RESURSE NECESARE

4.1.a. Echipamente şi materiale de laborator

- autoclav
- termostat la 37°C şi 42°C
- etuvă
- microscop optic
- hotă cu flux laminar
- frigider(vitrină frigorifică)

- balanţă de precizie
- lampă cu UV
- pH-metru
- bec de gaz Bunsen
- scală nefelometrică McFarland
- lupă
- lame de microscop portobiect şi lamele
- cristalizor
- anse şi fir de însămânţare
- coprocultoare cu linguriţă colectoare şi capac înfiletat
- cutii Petri
- hârtie de filtru
- eprubete 10/10 şi 12/12
- pense
- sticluţe de 8ml
- pipete automate
- vârfuri pipete automate
- psipete/pipete Pasteur
- stative eprubete
- jar de 2,5 l pentru incubare în condiţii speciale
- containere pentru colectarea materialelor contaminate incinerabile
- soluţii dezinfectante (soluţie clorinată şi amestec sulfocromic)
- recipiente pentru soluţii dezinfectante
- medii de cultură
- seruri de aglutinare pe lamă
- truse latex aglutinare
- truse pentru coloraţia Gram şi Ziehl Neelsen cu safranină
- soluţie Lugol
- coloranţi: albastru metilen şi verde malachit
- plicuri pentru incubare microaerofilă (Capygen) şi pentru anaerobioză
- reactivi adiţionali (reactiv Covaci şi reactiv Clorură ferică)
- discuri (benzi/ soluţie) pentru reacţia oxidazei
- perhidrol
- discuri pentru antibiogramă
- ser fiziologic
- ulei de cedru
- ulei de parafină
- parafină solidă

4.1.b. Materiale de referinţă

- tulpini de referinţă ATCC

Salmonella enterica ATCC 51812 TM
Shigella flexner ATCC 12022 TM
Yersinia enterocolitica ATCC 9610
Campylobacter jejuni ATCC 33291
E. Coli O157 H7 nontoxigenic strain NCTC 12900C 1967 I

4.1.c. RESURSE UMANE

- un medic
- doi asistenti de laborator

Măsuri de protecţie a personalului:
toate produsele biologice trebuie considerate potenţial infecţioase şi sunt recoltate şi manipulate conform regulilor de bioprotecţie.

4.2. PRODUSUL BIOLOGIC DE ANALIZAT : materiile fecale

Probele de MF sunt recoltate şi transportate la Laborator conform Manualului de recoltare a produselor biologice MRP-01 în intervalul orar 8^{00}-12^{00}; probele de MF prelevate în afara programului normal de lucru sunt depozitate în frigiderul de gardă (4-8°C), sunt recepţionate, înregistrate şi procesate la contravizită (dacă sunt aduse până la ora de începere a contravizitei), respectiv a doua zi dimineaţa (probe prelevate după încheierea programului de contravizită)

Modul de recepţionare, înregistrare şi transport al produselor biologice în Laborator se desfăşoară în conformitate cu MRP.

Criteriile pentru respingerea probei biologice sunt:
- recipient inadecvat
- lipsa mediului de transport
- cantitate insuficientă de produs biologic
- cantitate prea mare de produs biologic depasind nivelul de mediu de transport
- lipsa datelor de identificare de pe recipient
- lipsa formularului de solicitare

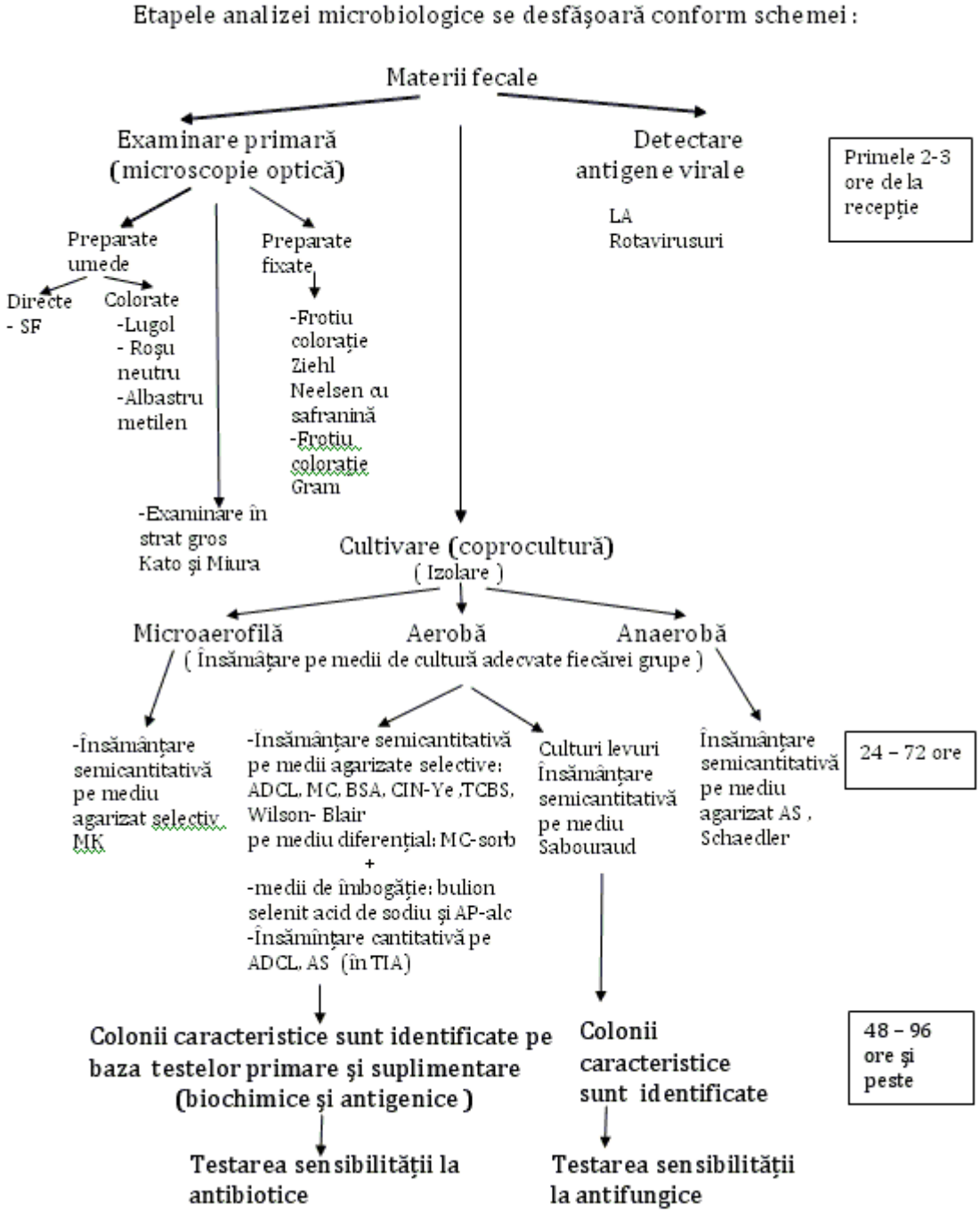
4.3. OPERAŢIUNI PREGĂTITOARE

Mediile de cultură, coloranţii sunt preparaţi conform instrucţiunilor de preparare, de către asistentul de laborator, în camera de preparare , sunt turnate în plăci Petri şi recipiente, în boxa de turnare medii , apoi sunt depozitate în vitrine frigorifice.
Sticlăria reciclabilă (eprubete, sticluţe, flacoane etc.) este pregătită pentru utilizare de către asistentul de laborator.
Materialele (plăci şi flacoane cu medii de cultură preparate) cât şi sticlăria (eprubete, sticluţe) sterilizate şi pregătite pentru utilizare, sunt aduse într-o cantitate estimată pentru 2-3 zile, de către asistentul de laborator ce deserveşte compartimentul de lucru , fiind depozitate în frigider (mediile de cultură) fie în cutii cu capac (eprubete, sticluţe, lame etc.).
Zilnic un număr estimat de plăci cu medii se pun la uscat în termostat înainte de utilizare şi se repartizează câte 2-3 ml mediu de îmbogăţire bulion selenit acid de sodiu, într-un număr estimat de sticluţe sterilizate.

4.4. ETAPELE ANALIZEI MICROBIOLOGICE

Etapele analizei microbiologice se desfăşoară conform schemei II

Schema II


Etapele analizei microbiologice se desfăşoară conform schemei:
Materii fecale
Examinare primară (microscopie optică)
Detectare antigene virale
LA
Rotavirusuri
Primele 2-3 ore de la recepţie
Preparate umede
Preparate fixate
Directe - SF
Colorate -Lugol - Roşu neutru -Albastru metilen
-Frotiu coloraţie Ziehl Neelsen cu safranină -Frotiu coloraţie Gram
-Examinare în strat gros Kato şi Miura
Cultivare (coprocultură) (Izolare)
Microaerofilă
Aerobă
Anaerobă
(Însămânţare pe medii de cultură adecvate fiecărei grupe)
-Însămânţare semicantitativă pe mediu agarizat selectiv MK
-Însămânţare semicantitativă pe medii agarizate selective: ADCL, MC, BSA, CIN-Ye ,TCBS, Wilson- Blair pe mediu diferenţial: MC-sorb
+
-medii de îmbogăţie: bulion selenit acid de sodiu şi AP-alc
-Însămînţare cantitativă pe ADCL, AS (în TIA)
Culturi levuri Însămânţare semicantitativă pe mediu Sabouraud
Însămânţare semicantitativă pe mediu agarizat AS , Schaedler
24 – 72 ore
Colonii caracteristice sunt identificate pe baza testelor primare şi suplimentare (biochimice şi antigenice)
Colonii caracteristice sunt identificate
48 – 96 ore şi peste
Testarea sensibilităţii la antibiotice
Testarea sensibilităţii la antifungice

Etapele examenului microbiologic sunt:
Etapa I în primele 24 ore:
- Examenul microscopic al MF
- Însămânţarea MF pe medii de cultură agarizate şi medii de cultură lichide de îmbogăţire, adecvate categoriei bacteriene, urmată de incubare 15-24 ore;
- Examenul virusologic al MF;

Etapa II după 15-24 ore

- Examinarea culturilor dezvoltate şi repicarea coloniilor suspecte pe bateria minimală de teste biochimice (TSI, mediul cu manită şi un sector de mediu diferenţial AABTL/Drigalski) urmată de incubare 15-24 ore;
- Efectuarea testelor primare -examinarea microscopică a unora din culturile bacteriene (frotiu colorat Gram), testul catalazei ,oxidazei şi coagulazei pentru alte culturi bacteriene;
- Reexaminarea primoculturilor, la 48 ore şi eventuale repicări a coloniilor suspecte dezvoltate tardiv;

Etapa III după 42-72 de ore
- Efectuarea testelor de identificare antigenică (aglutinare pe lamă, latex aglutinări);
- Repicarea coloniilor suspecte pe baterie lărgită de teste biochimice (apă peptonată pentru reacţia indolului, mediu cu lizină şi martor lizină, mediul cu fenilalanină, mediul Simons cu citrat, pe lângă TSI, mediul cu manită şi un sector de mediu diferenţial AABTL/Drigalski, iar pentru alte culturi bacteriene mediul agar cu esculină şi sector de AS) dacă bateria minimală nu a fost concludentă, şi se purifică culturile mixte;
- Efectuarea antibiogramei sau antifungigramei urmată de incubare 24 ore;
- Reexaminarea primoculturilor bacteriene la 72 ore şi eventuale repicări a coloniilor suspecte dezvoltate tardiv;
- Comunicarea rezultatelor examinării microbiologice a MF, prin întocmirea şi tipărirea buletinul de analiză, cod FGL – 5.8-01.

Etapa IV după 72-96 ore şi uneori mai mult
- Comunicarea antibiogramei sau antifungigramei;
- Stocarea culturilor bacteriene patogene şi înalt patogene în eprubete cu agar de stocaj urmată de incubarea lor 24 ore şi parafinarea eprubetelor.

5.0 PROCEDURA DE LUCRU

Examenul microscopic precede executare culturilor bacteriene.

5.1 EXAMENUL MICROSCOPIC:

- Include examinarea de preparate umede şi/sau fixate, având ca scop vizualizarea citologiei respectiv prezenţa sau absenţa recţiei inflamatorii cu sau fără prezenţa hematiilor cât şi a elementelor parazitare (trofozoiţi, chişti, ouă şi larve), a dominanţei fungilor şi prezenţa în exces a unor produşi de digestie (amidon, fibre musculare , mucus etc.)
- Permite identificarea produsului patologic prin depistarea resturilor alimentare nedigerate, si a elementelor de origine intestinala.
- Permite orientarea diagnosticului spre alte posibile etiologii ale BDA, decat cea bacteriana sau existenta unei etiologii mixte.

Elementele componente pe care le putem gasi:
- resturi alimentare nedigerate sau partial digerate`
- elemente de origine intestinala
- elemente de origine parazitara
- bacterii si levuri

A. Resturi alimentare:
- Fibre musculare striate apar ca urmare a ingerarii carnii

cele digerate au aspectul unor fragmente ovale mai mari sau mai mici, cu capete rotunjite si fara striatiuni, de culoare galbena sau galben aurie din cauza bilei; cand sunt

mai palide –transparente, poate denota o retentie de bila

cele partial digerate sau nedigerate au o culoare galben- inchisa si sunt de obicei mai lungi, au capetele drepte si striatii intacte, pastrandu-se atat desenul longitudinal cat si cel transversal; aparitia lor in numar mare, senifica o insuficienta pancreatica asociata sau nu hiposecretie de acid clorhidric sau un tranzit intestinal accelerat

- Grasimile se pot prezenta cel mai frecvent sub forma grasimilor neutre, care in cantitate mica se pot intalni si in mod normal; se prezinta sub forma de picaturi clare, usor galbui din cauza bilei , cu diametrul variabil.Prezenta unei cantitati mari de grasimi neutre, atrage atentia asupra unui proces de maldigestie de obicei printr-o insuficienta pancreato-biliara.
- Amidonul cu solutia Lugol, se coloreaza in albastru-violet inchis daca este nedigerat si in nuante mai deschise sau chiar in rosu , daca este digerat.

Amidonul inclus este cel organizat din interiorul celulelor (cartofi/leguminoase),se coloreaza in albastru si este inconjurat de o membrana.

Amidonul amorf este cel care a pierdut forma sa organizata si se prezinta sub forma de pete sau trasee albastrui.

Amidonul crud se intalneste mai rar si se prezinta ca gramajoare organizate in straturi concentrice, colorate aproape in negru.

Eritrodextrina, rezultata din digestia amidonului, se coloreaza in rosu. In cazul unor preparate bogate in amidon, in coloratia cu solutia Lugol, acestea iau in intregime culoarea inchisa, vizibila cu ochiul liber. Prezenta sa in cantitate mare, este consecinta unui tranzit intestinal mai accelerat.

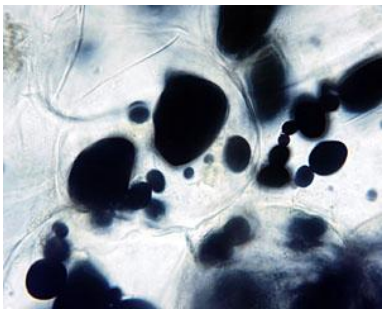
- Celuloza nedigestibila rezultata din alimentele vegetale, se prezinta sub forma de vase vegetale, peri vegetali, spori, graunte de polen, membrane in placarde mai mari sau mai mici, etc. Nu are o semnificatie semiologica.
- Cristale de origine alimentara, in special cristalele de oxalat de calciu intra sau extracelular, in cantitate mare pledeaza pentru o insuficienta gastrica.

B. Elemente de origine intestinala:

- Mucusul se prezinta sub forma unor flocoane transparente ce contin adesea globule rosii, globule albe, celule epiteliale, microbi.In afectiunile inflamatorii se intalneste o cantitate mai mare de mucus.
- Celule epiteliale cilindrice libere sau inclavate in mucus, denota un proces inflamator al peretelui intestinal, atunci cand sunt abundente; uneori se pot intalni si celule pavimentoase detasate odata cu eliminarea scaunului prin canalul anorectal.
- Hematiile intacte denota o hemoragie inferioara (rectala) sau una superioara dar cu un tranzit foarte accelerat; hematiile din hemoragiile digestive superioare nu pot fi recunoscute, fiind distruse.
- Leucocitele, izolate si in numar mic nu sunt semnificative; un numar mare de leucocite trebuie mentionat semnificand un proces inflamator sau ulcerativ care intereseaza segmentul terminal al tubului digestiv; ele abunda in procesele rectale neoplazice sau bacilare, in rectocolita ulcerohemoragica si in diferite boli infectioase cu localizare intestinala, in unelecazuri de dizenterie amibiana sau rectite parazitare, domina eozinofilele.
- Cristale de origine endogena: cristale Charcot-Leyden, au diferite marimi, incolore, se gasesc mai frecvent in diferite parazitoze intestinale. Cristale de hematoidina, de culoare rosie-galbuie sau bruna, romboidale, prismatice, etc. apar dupa diferite hemoragii digestive sau dupa o alimentatie bogata in alimente cu sange.

Cristal de hematoidina

Cristale Charcot-Leyden

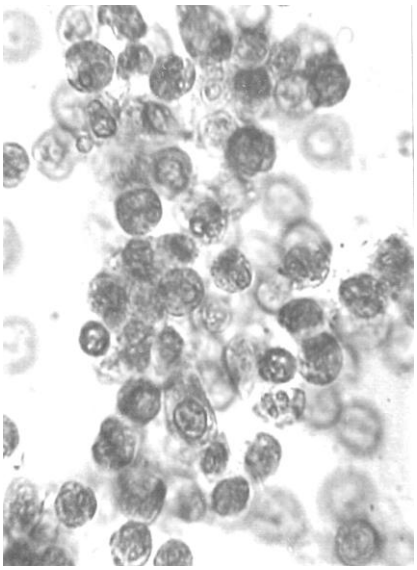


Amidon nedigerat

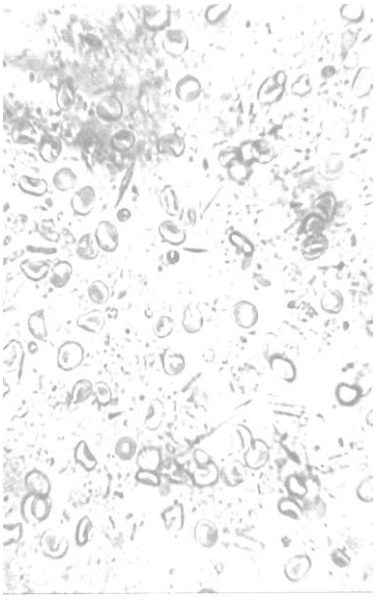
Cristal de acid uric

Lambou cilindric de mucus

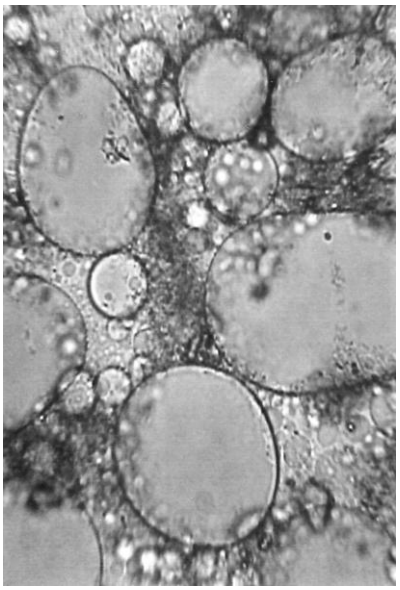
Par vegetal



Reactie inflamatorie – Leucocite



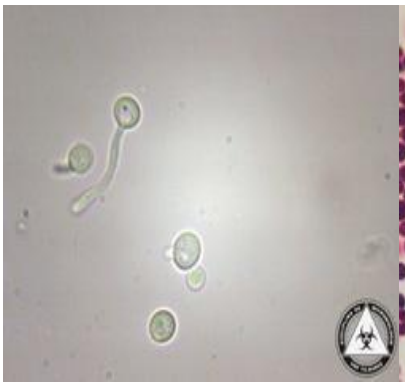
Hematii intacte

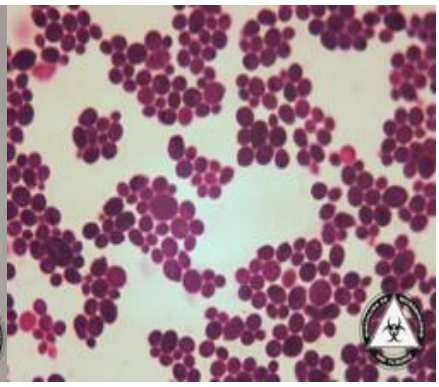


Bule de mucus

C. Elemente de origine parazitara si metodologia lor de identificare , a fost descrisa in PSL-M2-01

D.:Bacterii si levuri: pe preparate necolorate se observa abundenta florei microbiene, eventuala mobilitate a lor, asociata sau nu cu leucocite si hematii ca si prezenta si abundenta unor elemente micologice (levuri, pseudomicelii).


Blastospori cu filamente


Blastospori Gram pozitivi

Granule de polen

5.2 –COPROCULTURA

Coprocultura urmăreşte izolarea şi identificarea bacteriilor patogene şi înalt patogene pe baza caracteristicilor: morfologice , de cultivabilitate, exoenzimatice şi antigenice , implicate în BDA şi TIA

- Însămânţarea se face din proba ca atare recoltată în coprocultor cu mediu de transport Cary Blair, vizând porţiunile lichide şi îndeosebi cele mucoase şi/sau sangvinolente; volumul recoltei trebuie să fie minimum 3-5 mg;
- Mediile de cultură utilizate pentru izolare şi identificare bacteriană, cât şi condiţiile de incubare sunt specifice ficărei categorii bacteriene;
- Inocularea mediilor de cultură se realizează cu ansa, din MF omogenizate în mediul de transport, iar dispersarea inoculului se realizează în 3 grupe de striuri parţial suprapuse, fără flambarea ansei între grupele de striuri; din mediile de îmbogăţire, după o agitare prealabilă a eprubetelor, se procedează la fel; pentru Campylobacter spp., materia fecala se omogenizeaza in prealabil cu Apa peptonata (~5 ml Apa peptonata in eprubeta de 10/100 mm, in care se omogenizeaza materie fecala) si se mentine la temperatura camerei 15-20 minute, in pozitie vericala; dupa sedimentare, se preleva cu o ansa cu bucla mare, din mijlocul coloanei de lichid, si de insamanteaza cu dispersie pe mediul Karmali.
- Repicarea coloniilor suspecte se realizează cu firul de însămânţare, care va fi încălzit la roşu, la începutul şi sfârşitul fiecărei repicări;
- Specia bacteriană urmărită (uzual *Shigella, Salmonella*) este indicată de medicul specialist pe formularul de solicitare analize F-PGL-5.4-1 I Materii fecale; în afara solicitării medicale se urmăresc şi alte specii bacteriene , dacă examenul citologic evidenţiază prezenţa mai ales în număr mare a leucocitelor ± hematiilor (EPEC la nou-născut şi copilul mic, EHEC O:157 H:7, *Campylobacter* spp patogene), iar dacă proba de materii fecale este lichidă ca apa de orez se urmăresc în sezonul cald şi *Vbrio cholerae* / *parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* / *sobria* , *Plesiomonas shigelloides* etc. efectuându-se însămânţări pe medii de cultură adecvate;

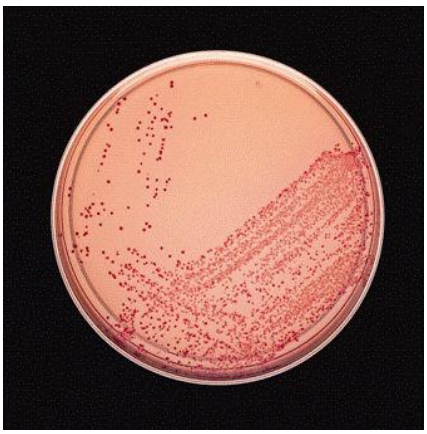
5.2.1 Caracteristici morfologice si de cultivabilitate

Pentru speciile Salmonella, Shigella, Escherichia coli si Yersinia enterocolitica, produsul patologic se insamanteaza pe mediile ADCL, MC-sorb, CIN-Ye si Bulion selenit acid de sodiu. Dupa incubare aeroba la 37°C timp de 16-24 de ore, se examineaza culturile dezvoltate.
Se observă de cele mai multe ori o varietate de colonii , morfologic deosebite, aparţinând unor specii bacteriene diferite. In cazul in care nu se obtin colonii izolate, pentru a obţine culturi pure, se repică si se dispersează pe sectoare de mediu ADCL, pentru a obţine subculturi pure.Dacă

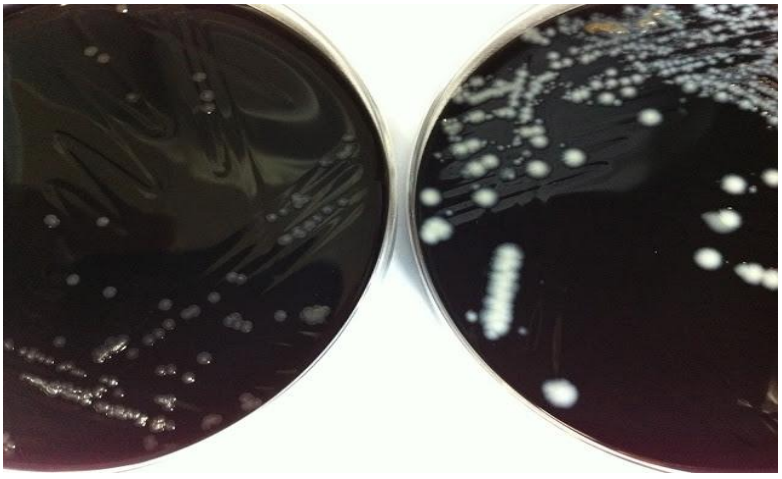
sunt colonii izolate suspecte, se pot însămânţa mediile de cultură pentru identificarea caracterelor biochimice.

Escherichia coli *Salmonella* *Shigella*

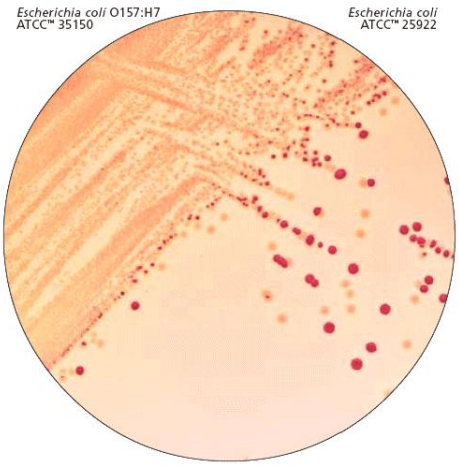
Mediu ADCL



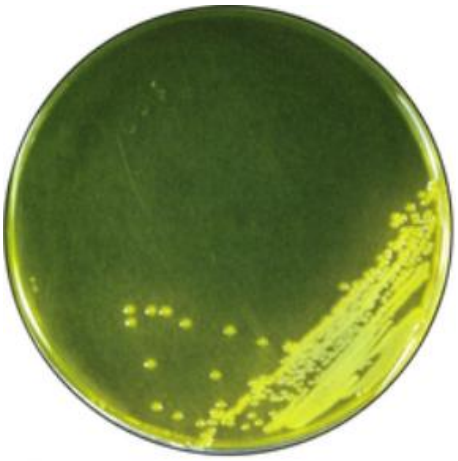
Yersinia enterocolitica (pe mediul CYNYe)



Mediu Karmalli:
Campylobacter spp. in stanga
Coliform in dreapta



Mediu Mc-sorb
EHEC –colonii translucide

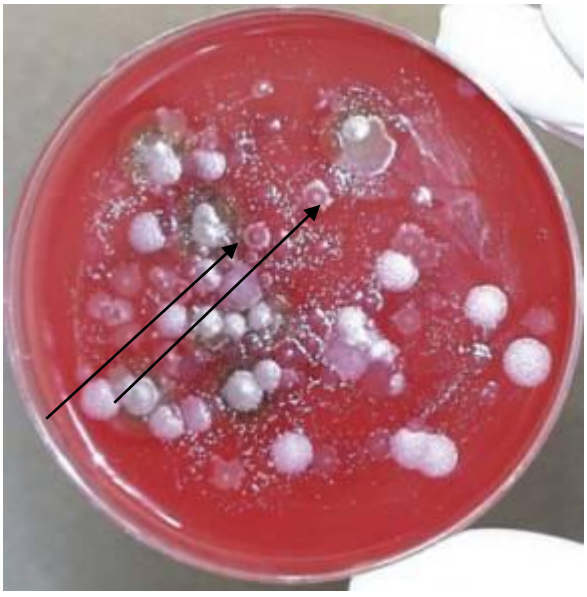


Vibrio cholerae - TCBS agar

Vibrio parahaemolyticus- TCBS agar

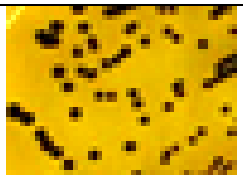
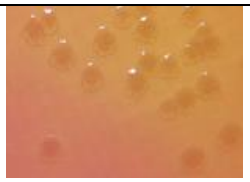
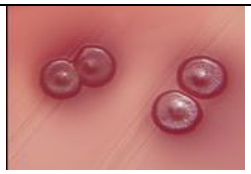
Bacillus cereus - AS

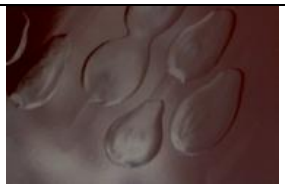
Bacillus cereus - AS

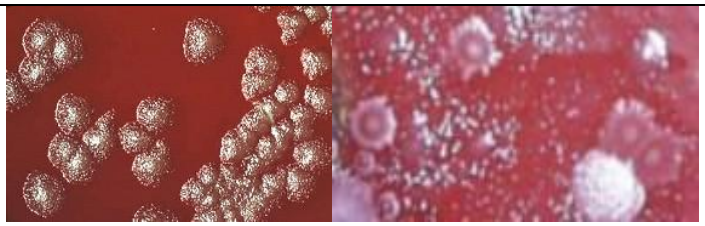


Bacillus antracis- AS

Aspectul coloniilor:

Specia	Aspectul coloniei pe mediul ADCL
Salmonella spp.	 Colonii de 1,5-2 mm, translucide cu central negru, lactoză negative, raportul dintre centrul negru şi periferia translucidă, este în favoarea părţii translucide
Salmonella typhi	 Colonii de 1-2 mm lactoză negative, cu un mic centru negru, care la unele colonii este foarte mic, sau apare mai târziu
Shigella spp.	 Colonii de 2,5-2,5 mm translucide, bombate sau mai aplatizate, lactoză negative
Yersinia enterocolitica	 Colonii 1-1,5 mm translucide, convexe, lactoză negative, care uneori se dezvoltă după 3-5 zile de incubare la temperatura camerei
Escherichia coli	 Colonii roşii sau roz intens, mai mult sau mai puţin opace de 2-3 mm, lactoză pozitive, mai puţin bombate
Proteus spp.	 Colonii mari de 2-3 mm, lactoză pozitive, bombate , cu centrul negru, raportul centrul negru şi partea roşie, este în favoarea centrului, cu miros de ouă clocite, datorită hidrogenului sulfurat.

Klebsiella spp.	 Colonii mari 2-4 mm cu tendinţă de confluare, bombate, convexe, culoare roz intens, în general lactoză pozitive
Yersinia enterocolitica	 Pe mediul CINYe, coloniile sunt de 1-2 mm, translucide cu centrul roşu
Campylobacter jejuni	 Colonii cenusiu-inchis cu tenta maronie si tendinta de a se intinde pe striul de insamantare- mediul Karmali
Vibrio parahaemolyticus	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Aeromonas hydrophila	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Vibrio cholerae	 Aspectul coloniilor pe mediul TCBS
Bacillus cereus	Colonii hemolitice, cu margini neregulate, La prelevarea coloniei cu ansa, aceasta se desprinde aidoma albusului de ou nebatut

Bacillus antracis	 Coloniile sunt non-hemolitice, plate sau uşor convexe, cu margini neregulate si aspectul sticlă mată. Există de multe ori proiecţii de la marginea coloniei care dau aspectul de " cap de meduza- " La prelevarea coloniei cu ansa, aceasta se desprinde aidoma albusului de ou batut

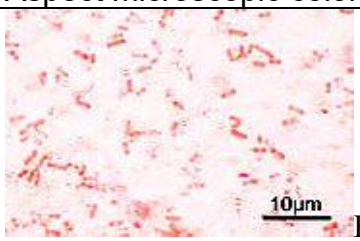
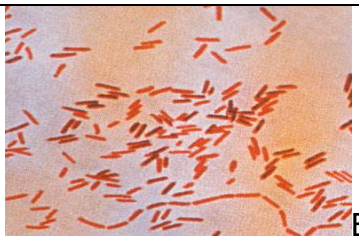
Incubarea pentru Campylobacter spp, se realizeaza la 40-42°C, in jar cu plic Campygen (care creiaza atmosfera de incubare propice cu azot), iar durata incubarii se prelungeste 48-72 de ore. Pentru Yersinia enterocolitica, incubarea la 37°C, a mediului ADCL, se prelungeste 2-3 zile la temperatura camerei- coloniile suspecte dezvoltate in aceste conditii se identifica pe baza caracteristicilor biochimice si antigenice.

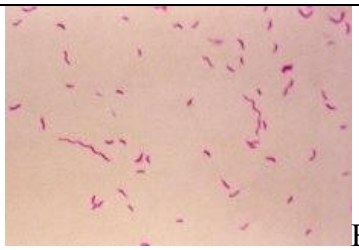
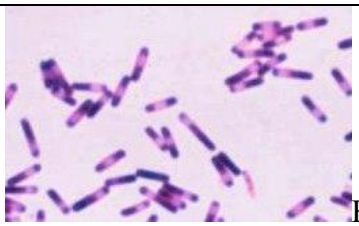
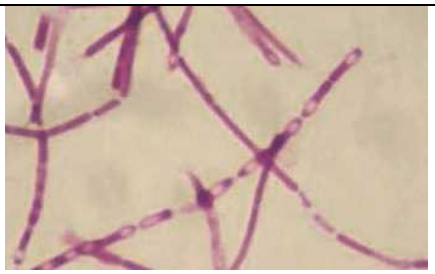
Pentru Vibrio, Aeromonade patogene si Plesiomonas shigelloides, insamantarea initiala se face pe mediul de imbogatire Apa peptonata alcalina si dupa incubare aeroba, se insamanteaza pe mediul BSA si TCBS; examinarea coloniilor dupa 24 h de incubare aeroba, cu efectuarea testelor primare (testul catalazei si testul oxidazei), orienteza diagnosticul.

Pentru Clostridium, insamantarea se face pe mediu special, incubarea in conditii de anaerobioza, in jar.

5.2.2 Examinarea microscopica a culturilor, este necesara pentru unele specii bacteriene: Campylobacter spp. si Vibrio / Aeromonade.

Caracteristici microscopice comparative

Specia bacteriana	Aspect microscopic coloratie Gram
Shigella spp.	 BGN
Salmonella spp.	 BGN

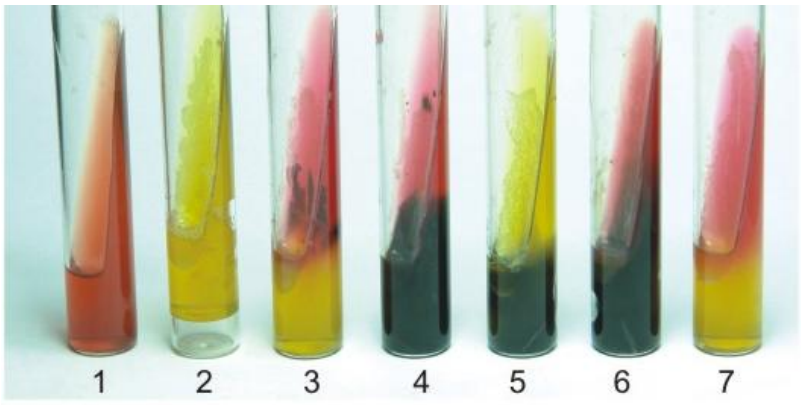
Campylobacter spp.	 BGN spiralati
Clostridium difficile	 BGP sporulati
Clostridium botulinum	BGP sporulati
Vibrio cholerae	
Bacillus cereus	BGP
Bacillus antracis	 BGP sporulati

5.2.3 Identificarea caracterelor exoenzimatice

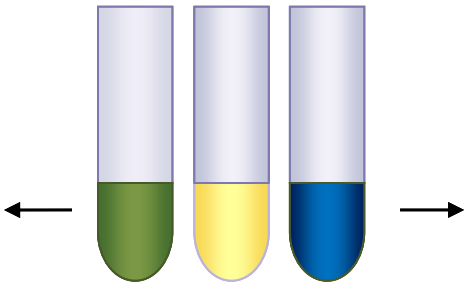
Colonii suspecte se repică pe medii de identificare a caracterelor biochimice. În general se execută 2-3 repicări din colonii diferite, dar asemănătoare morfologic. Repicarea se execută uzual pe mediul TSI si mediul agar cu manită şi uree, (pe care se urmăreşte mobilitatea, fermentarea manitei şi producerea de urează) şi un sector de mediu AABTL(mediu diferenţial pe care bacteriile lactoză pozitive produc virajul mediului în galben , iar cele lactoză negative, lasă mediul

nemodificat.

Mediul TSI



Neînsămânţat *E. coli* *Salmonella typhi* *Proteus spp.* *Citrobacter freundi* *Salmonella typhimurium* *Shigella flexneri*

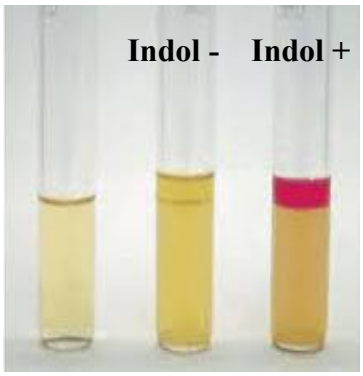


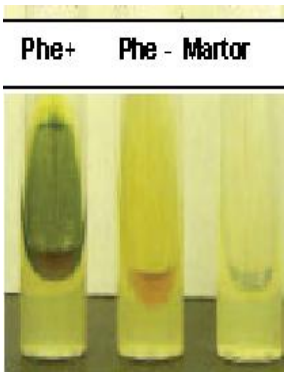
Neînsămânţat Urează pozitiv

Fermentarea manitei

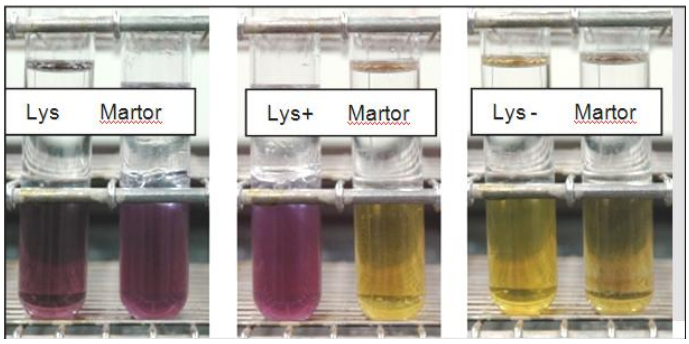
Mediu cu manita

Pentru cazurile neconcludente, se largeste bateria de teste pentru a obtine noi criterii de identificare.





Reacţia indolului Utilizarea citratului ca unică sursă de carbon Dezaminarea Phe



Decarboxilarea lizinei

Caracterele exoenzimatice:

Specia	Mobi-litate	Glu-coza	Lac-toza	Zaha-roza	Hidro-gen sulfurat	Gaz din glucoză	Indol	Li-zină	Ci-trat	Phe	Urea za	Manitol	Oxidaz a
Salmonella spp.	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Salmonella typhi	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	-	-	-
Shigella flexneri	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- exceptie varianta manita negativa	-
Shigella sonnei	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
Shigella dysenteriae	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	-
E. coli	+ excepti e E.coli inactiv	+	+	V	-	+	+	d	-	-	-	-	-
Yersinia enterocoliti ca	- 37° + 25°	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Campylo bacter spp.	+	-	-	-	-/+	-					-	-	+
Vibro spp.	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Aeromonas spp.	+	+	+/-	+/-	-	+/-	+	+/-	-	-	-	+/-	+
Plesiomonas shigelloides	+ (slab)	+	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	+ aglutina re + cu ser anti Shigella sonnei

5.2.4 Identificarea caracterelor antigenice

Identificarea caracterelor antigenice se realizează cu seruri pentru aglutinarea pe lamă. Pentru *Salmonella* spp. se utilizează:

- Seruri polivalente care conţin aglutinine pentru:

grupele ABDEL (conţine aglutininele 1,2,12 +4,5,12 +9,12 9,46 + 3,10 +3,15 +1,3,19)

şi separat pentru

grupele CFGH (conţine aglutinine 6,7 +6,8 +11+13,22 +13,23 +6,14,24 +8,20)

- Serururi monovalente de grup:

grup B (O:4,5)
grup D (O:9)
grup C (O:6,7,8)
grup E (O:9,12,26)
grup A (O:1,2)

- Ser monovalent Vi
- Seruri flagelare h

Aglutinarea cu unul din serurile polivalente de grup (aglutinare netă, uşor vizibilă cu ochiul liber, în 60 de secunde)denotă apartenenţa tulpinii la una din grupele majore cuprinse în ser; se continuă cu serurile monovalente de grup, grupele B şi D fiind cele mai frecvente, se începe aglutinarea cu ele (aglutinare netă, uşor vizibilă cu ochiul liber, în 60 de secunde)

Dacă nu aglutinează cu nici unul dintre serurile polivalente, şi caracterele exoenzimatice sunt pentru *Salmonella* spp.,se încearcă aglutinarea cu Ser monovalent Vi dacă aglutinează în 30 de secunde, aglutinare netă, vizibilă cu ochiul liber, se poate afirma că tulpina poate fi *Salmonella typhi* sau paratyphi. Se termoinactivează tulpina, şi se reiau aglutinările cu serurile polivalente, monovalente şi seruri h (h::d, h:c, h:a, h:b)

Cu ajutorul serurilor polivalente si monovalente precum si a serurilor h (antigene H) se pot determina serotipurile genului Salmonella conform clasificarii Kauffman–White

Pentru Shigella spp. , sunt seruri:

Polivalent flexneri
Polivalent sonnei
Anti Boydi C1, C2, C3
Antidysenteriae 1-7
Antidysenteriae 8-12

Pentru Yersinia enterocolitica, sunt serul monovalent O3 şi O9.

Pentru EPEC sunt :

Ser nonavalent
Ser trivalent 1 (Mixtură de 3 Serotipuri O111+O55+O26)
Ser trivalent 2 (Mixtură de 3 Serotipuri O86+O119+O127)
Ser trivalent 3 (Mixtură de 3 Serotipuri O125+O126+O128)
Ser trivalent 4 (Mixtură de 3 Serotipuri O114+O124+O142)

- Bacteriile patogene şi înalt patogene izolate şi identificate pe baza testelor biochimice şi antigenice sunt testate pentru sensibilitatea şi rezistenţa la antibiotice si stocate în eprubete cu mediu agarizat de transport, parafinate şi expediate la Institutul „I. Cantacuzino”-Bucureşti, pentru confirmarea identităţii şi tipare bacteriană.

Pentru EHEC O:157H:7 identificarea antigenica se face prin latex aglutinare, kitul continand, martor pozitiv si martor negativ.

Pentru Campylobacter spp. enteropatogene kitul contine carduri dryspot, precum si martor pozitiv si negativ.

5.2.5 COPROCULTURA ÎN TIA

Avand in vedere plurietiologia TIA, metodologia examenului microscopic se aplica si in aceste cazuri iar insamantarile semicantitative se executa pe toate mediile de cultura, inclusiv pe AS, pentru urmarirea stafilococilor, streptococilor si a speciilor de Bacillus in special Bacillus cereus. In paralel se executa coprocultura cantitativa, prin diluarea materiilor fecale in ser fiziologic, astfel incat sa obtinem o dilutie finala de 10^{-5} si $10^{-7,}$ prin insamantarea a 0,1 ml din dilutia 10^{-3} respectiv10^{-5}, pe mediul ADCL si AS. Scopul acestei metode este de a determina specia bacteriana patogena sau conditionat patogena care se gaseste intr-o cantitate mare, peste limita acceptata, pentru continutul materiilor fecale.

NOTA:

Aceasta metodologie de insamantare cantitativa se aplica si in situatiile in care in care medicul clinician solicita coprocultura pentru bacterii conditionat patogene: *Psudomonas aeruginosa, Klebsiella spp, Serratia marcescens* ((sindromul scutecului rosu)., sau se estimeaza proportia coloniilor dezvoltate si identificate din aceeasi specie bacteriana.

Schema dilutiilor pentru coprocultura cantitativa:

Nr. Epriubeta	**1**	**2**	**3**
Ser fiziologic	9 ml	10 ml +	10 ml +
Materii fecale	~ 1 mg (o ansa cu bucla mare)	0,1 ml	0,1 ml
	omogenizare	omogenizare	omogenizare
Dilutia	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}
Cantitate folosita pentru insamantare	-	0,1 ml	0,1 ml
Dilutia finala pe placa	-	10^{-5}	10^{-7}

Dupa 24 ore de incubare, se numara coloniile morfologic identice. Calcul: Nr. Colonii X dilutia. Daca numarul coloniilor dezvoltate este mai mare de 1X 10^{-7} pentru bacterii conditionat patogene (din aceeasi specie bacteriana), atunci acestea pot fi considerate implicate in etiologia TIA.

5.2.6 Coprocultura in micoze intestinale

Se executa la indicatia medicului clinician sau in cazurile in care examenul microscopic depisteaza prezenta levurilor in cantitate mare si dominanta lor in comparatie cu flora bacteriana uneori diminuata pana la disparitie. Izolarea levurilor se face prin cultivare pe mediul Sabouraud . Pentru a incrimina etiologia micotica, intr-un sindrom diareic, este necesar a determina numarul de unitati formatoare de colonii/ gram sau ml materii fecale si identificarea levurilor respective.

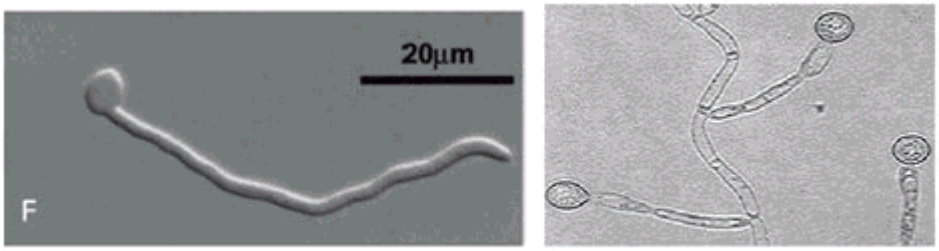
Schema dilutiilor pentru coprocultura cantitativa: pentru levuri

Nr. Eprubeta	**1**	**2**	**3**
Ser fiziologic	9 ml	10 ml +	10 ml +
Materii fecale	~ 1 mg (o ansa cu bucla mare)	1 ml	0,1 ml
	omogenizare	omogenizare	omogenizare
Dilutia	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Cantitate folosita pentru insamantare	-	0,1 ml	0,1 ml
Dilutia finala pe placa	-	10^{-3}	10^{-4}

In paralel cu insamantarea cantitativa din dilutiile 2 si 3 , se insamanteaza si din dilutia initiala, prin dispersie cu ansa, pe mediul Sabouraud. Se incubeaza la 25-37° timp de 2-3 zile. Se numara coloniile dezvoltatesi se face calculul levurilor dupa formula: Nr. UFC X dilutia.Daca numarul coloniilor este mai mare de 10^{-9}, acestea pot fi implicate in diareea candidozica. *Candida albicans* , detine rolul major in etiologia micotica a sindromului diareic la imunodeprimati dupa antibioterapie de lunga durata, etc. Alte levuri se pot intalni in scaunul diareic, dar rolul lor in etiologia BDA este discutabila.

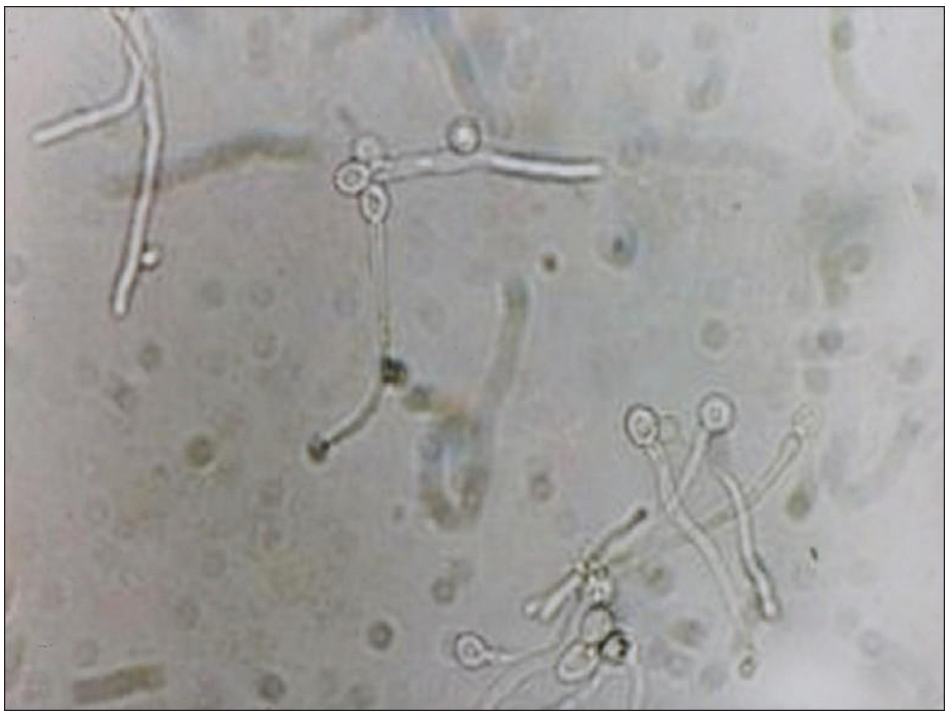
Identificarea pentru *Candida albicans* se bazeaza pe testul de filamentare (testul tubului germinativ)

Candida albicans



Germ Tube (no constriction) Pseudohyphae (constriction)

Diferenta fata de pseudohife



Testul filamentarii

- Se utilizează mediul Sabouraud cu sau fără inhibitori pentru bacteriile aerobe din materiile fecale;

- Însămânţarea MF este identică ca la coprocultura bacteriană, identificarea se realizează prin testul filamentării sau identificare pe galerii API , iar la solicitarea medicului curant se efectueaza antifungigrama.

6.0. CONTROLUL DE CALITATE

Reactivii necesari, mediile de cultură, sunt controlate cu tulpini de referinţă existente la nivelul compartimentului.

Tulpini de referinţă: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610;

Aceste controale sunt introduse în lucru la fiecare lot de medii de cultură achiziţionate sau ori de câte ori este nevoie.

Tulpinile izolate si identificate se expediaza la Institutul „I. Cantacuzino” Bucuresti, pentru confirmarea identitatii bacteriene.

Periodic se executa insamantari paralele, din aceeasi proba biologica si comparari interpersonale (a doua opinie).

7.0 COMUNICAREA REZULTATELOR SI VALORI DE REFERINTA

A.Examen citologic: Valoare de referinta : Absente/rare leucocite

“Rare leucocite (≤ 2-5 leucocite/ camp microscopic-obiectiv 40x)” in holera, viroze, etc.

“Reactie inflamatorie moderata (≥ 20 leucocite/camp microscopic-obiectiv 40x)” in salmoneloze, amoebioza, etc.

„Reactie inflamatorie importanta (≥ 50 leucocite/camp microscopic-obiectiv 40x)”in shigeloze

Dupa caz, se precizeaza prezenta/absenta hematiilor.

B.Examen parazitologic: Valoare de referinta: Absente structuri parazitare

„ Prezent...” – se mentioneaza parazitul identificat

C.Examen micologic: Valoare de referinta: Absente/rare levuri

„ Prezente numeroase levuri/ pseudomicelii”

D. Examen digestie in Lugol: Absenti produsi anormali de digestie

E. Coprocultura: Valoare de referinta: Negativa (se precizeaza specia bacteriana cultivata)

„ Coprocultura pozitiva pentru....” .....(se precizeaza specia bacteriana cultivata si identificata)

F. Coprocultura cantitativa: Valoare de referinta: Negativa la dilutia 10^{-5} si 10^{-7}

„ Nr.colonii x dilutia ”.....(se precizeaza specia bacteriana cultivata si identificata)

7.1 Raportare rezultate:

1. în baza de date a Spitalului
2. medicului curant / pacientului prin Buletinul de analiza
3. Directiei de Sanatate Publica –Iasi, conform metodologiei anuale de supraveghere a teritoriului pentru BDA.

8.0 SURSE DE EROARE

Pot fi cauzate de:

- prelevarea probelor biologice dupa instituirea antibioterapiei
- lipsa mediului de transport care mentine viabilitatea trofozoitilor, larvelor si bacteriilor
- stocarea probelor biologice recoltate in mediu de transport mai mult de 18-24 ore la temperatura camerei ceea ce permite dezvoltarea florei microbiene de asociatie
- etichetare gresita a probei sau inregistrare incorecta in Registrul de comenzi interne/ Registrul de analiza –rezultatul analizei se comunica pentru alt pacient.
- eroare de interpretare a caracterelor biochimice si antigenice al bacteriilor, corectabile prin comparari interpersonale si bilaterale intre intre laboratoare

9. 0 RESPONSABILITĂŢI

MANAGERUL TEHNIC:

- Verifică şi aprobă prin semnătură şi parafează buletinul de analiză, cod FGL- 5.8-01
- Oferă consultanţă beneficiarului în legătură cu rezultatul analizei, dacă acesta solicită
- Execută analizele pentru care este responsabil şi validează rezultatul acestora prin semnătură şi parafă

RESPONSABILUL DE ANALIZĂ

- Verifică solicitarea medicului specialist de pe formularul de solicitare analize
- Verifică înregistrările asistentului de laborator ce deserveşte compartimentul 02, din registrul de lucru
- Examinează preparatele de microscopie optică şi culturile bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, execută repicările, aglutinările pe lamă şi latex aglutinările, interpretează caracterele exoenzimatice dezvoltate de bacterii şi a aglutinărilor pe lamă, respectiv a latexaglutinărilor, decide asupra testelor pe care le execută asistentul de laborator şi formulează diagnosticul de laborator în registrul de lucru
- Întocmeşte şi tipăreşte buletinul de analiză
- Verifică, semnează şi parafează buletinul de analiză, cod FGL-5.8-01 şi îl prezintă managerului tehnic spre aprobare

ASISTENTUL DE LABORATOR

- Preia coprocultoarele cu probe biologice concomitent cu formularele de solicitare analize de la registratorul medical din camera de receptură.
- Înregistrează probele biologice cu toate datele din formularele de solicitare analize, inclusiv ID-ul probelor în registrul de lucru.
- Transportă mediile de cultură şi sticlăria pregătite pentru utilizare, în compartimentul de lucru şi pregăteşte mediile de cultură pentru însămânţare.
- Efectuează însămânţarea produselor biologice pe medii de cultură, pregăteşte preparatele pentru microscopie optică, efectuează unele teste de laborator indicate de medic
- Transmite buletinul de analiză, registratorului medical respectiv asistentului medical de la cabinetul de recoltare

10.0 ÎNREGISTRĂRI ŞI ANEXE

- Registrul de comenzi interne/externe –pentru probele acceptate 4.4. - 01 I E
- Registrul de comenzi respinse- pentru probele necorespunzatoare RGL 4.4- 02
- Registrul de analize RGL – 4.4 – 01 I - MATERII FECALE
- Bulletin de analiza FGL- 5.8 - 01